

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

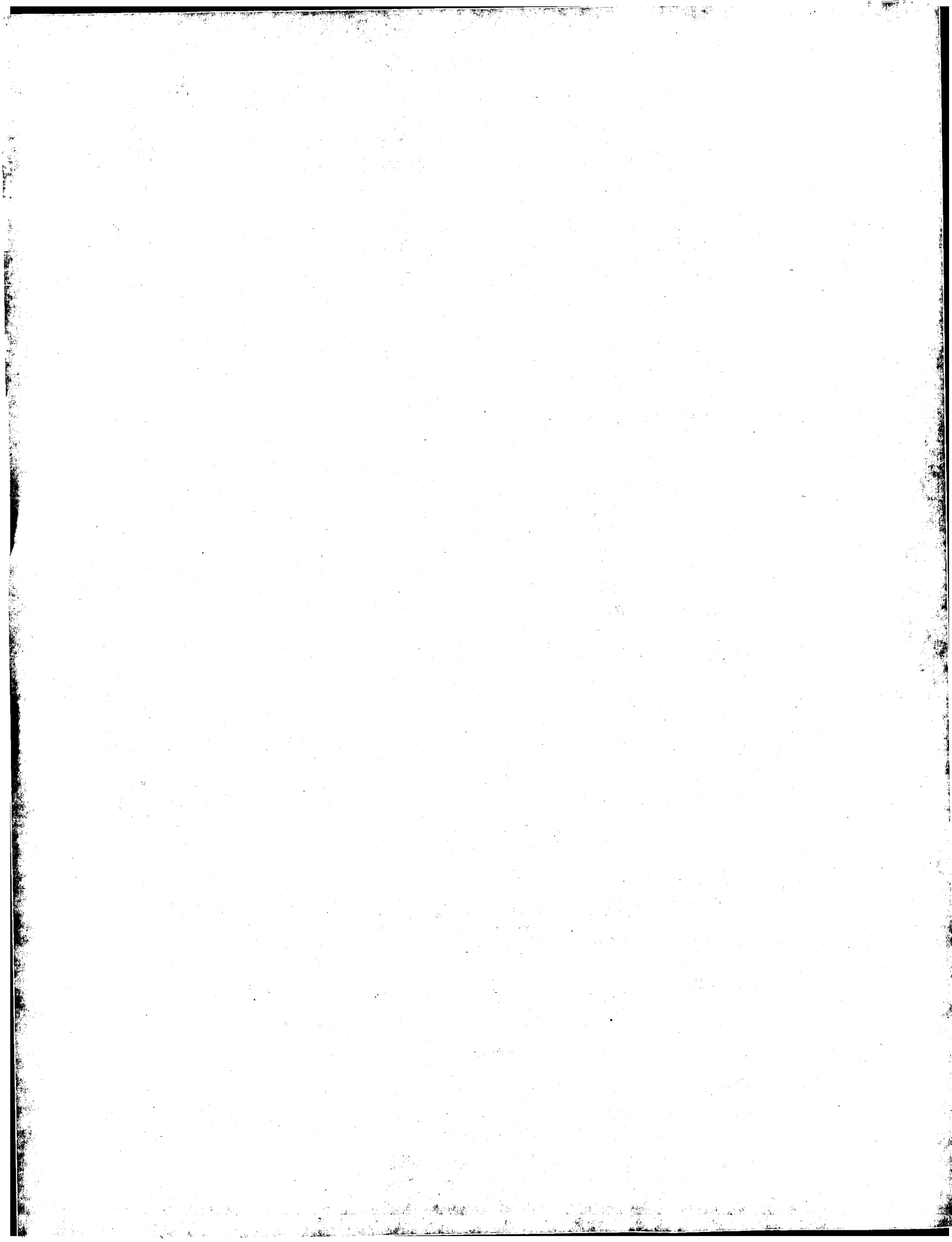
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**





PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 5/06, 5/16, A01K 67/027, C12Q 1/02, C12P 21/08, C07K 16/28, C12N 15/63</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/14203</p> <p>(43) 国際公開日 2000年3月16日(16.03.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04768</p> <p>(22) 国際出願日 1999年9月2日(02.09.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/248860 1998年9月2日(02.09.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115-8543 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 名取 修(NATORI, Osamu)[JP/JP] 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka, (JP) 田村政彦(TAMURA, Masahiko)[JP/JP] 〒104-8301 東京都中央区京橋2丁目1番9号 中外製薬株式会社内 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: METHOD FOR PREPARING CELL FRACTION CONTAINING HEMATOPOIETIC STEM CELLS</p> <p>(54)発明の名称 造血幹細胞を含む細胞画分の調製方法</p> <p>(57) Abstract Hematopoietic stem cells are successfully separated at a higher yield than those achieved in the prior art by separating cells having the Lin(-)/Sca-1(+)/c-kit(+)/CD48(-) phenotype from myeloid cells by using a cell sorter.</p>		

(57)要約

骨髓細胞からLin(-)/Sca-1(+)/c-kit(+)/CD48(-)の表現型を有する細胞をセルソーターにより分離することで、従来より高い回収率で造血幹細胞を分離することに成功した。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア
HA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TD	チャド
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TT	トリニダード
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	HR	クロアチア		共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IN	インド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IS	アイスランド	MX	メキシコ	US	米国
CM	カメルーン	IT	イタリア	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	JP	日本	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	KE	ケニア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KP	北朝鮮	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KR	韓国	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ			RO	ルーマニア		
DK	デンマーク						

明細書

造血幹細胞を含む細胞画分の調製方法

技術分野

本発明は、造血幹細胞を含む細胞画分の調製方法、該方法により製造された細胞画分、および該細胞画分の用途に関する。

背景技術

造血幹細胞は、顆粒球系細胞(myeloid)、リンパ球系細胞(lymphoid)、赤血球系細胞(erythroid)、巨核球系細胞(megakaryocytic)等を含む全ての血球細胞へ分化する能力を有し、且つ自己複製能を有する細胞として、その存在が古くから示唆されてきた。造血幹細胞の研究はマウス及びヒトの骨髓細胞を用いて行われてきており、これまでにCFU-S (Till J. E.ら, Radiat. Res. 14, 213, 1961)、HPP-CFC (Bradley T. R.ら, Blood 54, 1446, 1979)、LTC-IC (Sutherland H. J.ら, Blood 74, 1563, 1989)等が造血幹細胞の候補として挙げられてきた。しかしながら、これらの細胞は必ずしも造血幹細胞の性質を有しておらず、また、いずれも特殊なバイオアッセイにより検出される活性に基づいて定義された細胞であり、これらの細胞自体を分離することはできなかった。

一方、細胞の表面抗原の解明とFACSに代表される細胞分離技術の進歩により、特異的な表面抗原の発現を指標として、ある程度均一な細胞集団として造血幹細胞を分離することが可能となった。例えば、マウスに関しては、リンパ球、顆粒球、単球/マクロファージ、赤血球の各系統における分化抗原(Lin抗原)陰性(Lin(-))、Thy-1.1抗原陰性(Thy-1.1(-))、且つSca-1抗原陽性(Sca-1(+))である細胞画分(Lin(-)/Thy-1.1(-)/Sca-1(+))、あるいはWGAやc-kit を用いて、Lin(-)/Sca-1(+)/WGA(+)やLin(-)/Sca-1(+)/c-kit (+)の表現型を有する細胞

画分が、造血幹細胞を含む細胞集団として報告されている(Spangrude G. J.ら, Science 241, 58, 1988: Jurecic R.ら, Blood 82, 2673, 1993: Okada S.ら, Blood 80, 3044, 1992)。ヒトに関しても、CD34(+)/DR(-)やCD34(+)/CD38(-)などが造血幹細胞を含む細胞画分として報告されている(Brandt J.ら, J. Clin. Invest. 82, 1017, 1988: Sauvageau G.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. US A 91, 12223, 1995)。特にマウスに関しては、造血幹細胞レベルの疾患の解明や新たな治療法の開発の基礎検討に供することが可能であることから、これらの細胞画分に属する細胞の性質が比較的詳しく調べられているが、上記のいずれの表面抗原を指標とした分離方法により得られた細胞も造血幹細胞の割合が低いという問題が残されていた。例えば、Lin(-)/Sca-1(+)/c-kit(+)の表面抗原を有する細胞群では、造血幹細胞の含まれる割合は1/30と報告されている(Osawa, M.ら, J. Immunol., 156: 3207-3214 (1996))。ごく最近になって、造血幹細胞の分離方法として、マウス骨髓細胞からLin(-)/Sca-1(+)/c-kit(+)/CD34(-)の表現型を有する細胞画分を分離する方法が開発された(Osawa M.ら, Science 273, 242, 1996)。この方法では分離された細胞画分には従来法に比較して造血幹細胞が多く含まれているものの、1匹のマウスから得られる細胞数が50~100個と少なく、大量の造血幹細胞を要する実験、特に造血幹細胞増殖因子の探索や薬剤の探索を目的とするスクリーニング実験を行うことは困難であった。

発明の開示

本発明は、造血幹細胞を高頻度を含む実質的に均一な細胞画分を効率的に調製するための方法、該方法により調製された細胞画分、および該細胞画分の用途を提供することを課題とする。

本発明者らは、造血幹細胞の分離方法に関する前記したような知見をふまえ、より効率のよい造血幹細胞の調製方法を開発することを目的として鋭意研究

を積み重ねた結果、驚くべきことに、リンパ球、NK細胞、単球に発現している表面抗原として知られていたCD48を造血幹細胞の分離のための新たな指標として公知の指標と組み合わせて利用することにより、造血幹細胞を高頻度を含み、しかもスクリーニング実験等に供するに足る数の造血幹細胞を含む細胞画分を調製することができることを見出した。また、X線照射した雌性C57B1/6Nマウスへの移植実験から、該細胞画分が多分化能および長期造血能を有する造血幹細胞を含むことを見出した。さらに、本発明者等は、これにより調製した細胞画分を利用して、造血幹細胞増殖因子のスクリーニングなどを行うことが可能であるとの知見を得て、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、造血幹細胞含有細胞画分の効率的な調製方法、該方法により調製された細胞画分、および該細胞画分の用途に関し、より具体的には、

- (1) マウス骨髓細胞からLin抗原陰性、Sca-1抗原陽性、c-kit抗原陽性、CD48抗原陰性の表現型を有する細胞を分離することを特徴とする、マウス造血幹細胞を含む実質的に均一な細胞画分の調製方法、
- (2) CD34抗原陰性の表現型をさらに有する細胞を分離することを特徴とする、(1)に記載の方法、
- (3) (1)または(2)に記載の方法により調製された、マウス造血幹細胞を含む実質的に均一な細胞画分、
- (4) インビトロ培養細胞である、(3)に記載の細胞画分、
- (5) (3)に記載の細胞画分及び培養液を含む細胞組成物、
- (6) (3)に記載の細胞画分を移植することを特徴とする、キメラマウスの作製方法、
- (7) (3)に記載の細胞画分が移植されたキメラマウス、
- (8) 造血能が低下または欠損したマウスに(3)に記載の細胞画分を移植することにより作製されたキメラマウス、
- (9) 造血幹細胞の増殖または分化を促進する化合物をスクリーニングする

方法であって、

(a) (8) に記載のキメラマウスに、被検化合物を投与する工程、

(b) 該キメラマウスに移植された造血幹細胞の増殖または分化を検出する工程、および

(c) 被検化合物非投与の場合と比較して、造血幹細胞の増殖または分化を促進する化合物を選択する工程、を含む方法、

(10) 造血幹細胞の増殖または分化を促進する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) (3) に記載の細胞画分に被検化合物を接触させる工程、

(b) 被検化合物を接触させた細胞画分を培養する工程、

(c) 培養した細胞画分を造血能が低下若しくは欠損したマウスに移植する工程、

(d) 該マウスに移植された造血幹細胞の増殖または分化を検出する工程、および

(e) 被検化合物を接触させない細胞画分を移植した場合と比較して、造血幹細胞の増殖または分化を促進する化合物を選択する工程、を含む方法。

(11) 造血幹細胞の増殖または分化を促進する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) (3) に記載の細胞画分に被検化合物を接触させる工程、

(b) 被検化合物を接触させた細胞画分を培養し、造血幹細胞の増殖または分化を検出する工程、および

(c) 被検化合物非投与の場合と比較して、造血幹細胞の増殖または分化を促進する化合物を選択する工程、を含む方法、

(12) (9) から (11) のいずれかに記載の方法により単離しうる、造血幹細胞の増殖または分化を促進する化合物、

(13) 外来遺伝子が発現可能に導入された、(3) に記載の細胞画分、

(14) 特定の内因性遺伝子の発現が抑制されていることにより特定の表現系を有する非ヒト哺乳動物に、該内因性遺伝子に対応する外来遺伝子が導入された(13)に記載の細胞画分を移植し、該表現系が改善されるか否かを検出することを特徴とする、該特定の内因性遺伝子の発現の抑制に起因する疾患に対する治療効果の検出方法、

(15) (14)に記載の検出方法に用いるための、(13)に記載の細胞画分、

(16) (3)に記載の細胞画分を動物に免疫する工程を含む、造血幹細胞に特異的な抗体の製造方法、

(17) (16)に記載の方法により製造しうる、造血幹細胞に特異的な抗体、

(18) (17)に記載の抗体を用いることを特徴とする、造血幹細胞を単離する方法、

(19) (17)に記載の抗体を用いることを特徴とする、造血幹細胞を定量する方法、

(20) (17)に記載の抗体を用いることを特徴とする、造血幹細胞に特異的な表面抗原の検出方法、および

(21) (20)に記載の方法により検出しうる、造血幹細胞に特異的な表面抗原、を提供するものである。

本発明は、第一に、造血幹細胞を高頻度に含有する実質的に均一な細胞画分の調製方法に関する。本発明の細胞画分の調製方法は、Lin抗原陰性、Sca-1抗原陽性、c-kit抗原陽性、CD48抗原陰性（以下、それぞれLin(-)、Sca-1(+)、c-kit(+)、CD48(-)と称する）の表現型を指標に細胞を分離することを特徴とする。本発明において「実質的に均一な細胞画分」とは、上記表現型を有する細胞群をさす。「高頻度」とは、これら細胞群中における造血幹細胞の割合が、少なくとも1/24以上、好ましくは1/20以上、さらに好ましくは1/10以上、最も好

ましくは1/6以上であることを指す。

細胞群に含まれる造血幹細胞の割合は、例えば、キメラマウスの作成において、移植した細胞数とキメリズムの成立したマウスの匹数との割合から算出することができる。

また、細胞画分が造血幹細胞を含むか否かは、例えば、実施例2に記載のように、調製した細胞群が長期造血能を有するか否かを判定することにより決定することができる。

すなわち、造血幹細胞を含む細胞画分を移植した後、少なくとも60日以上、好ましくは140日以上さら好ましくは1年以上経過した時点で、レシピエントマウスの末梢血を採取し、低張高温下で細胞を破壊して得られる遺伝子を解析し、ドナーに特異的な遺伝子、例えばSry遺伝子、等のマーカーを検出することでドナー由来の血液細胞の存在を確認できれば長期造血能を有すると判定することができる。造血幹細胞を含む細胞画分は骨髓細胞、脾臓、末梢血から採取することができるが、存在比率が高い点で骨髓細胞を用いることが好ましい。

Lin(-)/Sca-1(+)/c-kit(+)/CD48(-)の細胞は、例えば、実施例1に示したように、Lin、Sca-1、c-kit、CD48に対する抗体を用いて、セルソーターにより分離することができる。造血幹細胞をさらに分離するためには、さらにCD34抗原陰性（以下、CD34(-)と称する）の指標を組み合わせ用いてもよい。上記指標で分離した後に、Lin、Sca-1、c-kit、CD48に対する抗体を標識した物質とは異なる蛍光物質（例えば FITC、PE、RED613、APC、Texas Red等）で標識した抗CD34抗体を用いて、セルソーターにより分離することで、さらにCD34(-)である画分を分離することができる。また、CD34に対する抗体と一緒に組み合わせてもよい。

本発明の細胞画分は、一般的な培養液、例えばDMEM、MEM、RPMI1640、IMDM等を用いて培養することができる。この培養液中には、通常の細胞培養に用いる添加物、例えば、牛胎児血清、インシュリン、IL-3、IL-6等の種々の造血因

子や、場合によっては細胞の生存・増殖を支持するフィーダー細胞としてX線処理等で増殖能を欠損させた骨髓細胞または骨髓ストローマ細胞を用いることができる。

本発明において調製された細胞画分は、例えば、造血幹細胞の増殖または分化を促進する因子のスクリーニングに有用なキメラマウスの作製に用いることが可能である。該キメラマウスの作製においては、レシビエントマウスに致死量あるいは半致死量のX線全身照射を行うことで造血能を欠損あるいは低下させ、分離した細胞画分を尾静脈より移植する。レシビエントマウスに致死量のX線を照射したときは、レシビエントと同系のマウスから一般的な方法で採取した骨髓細胞を、レスキュー細胞として約 $2 \times 10^5 \sim 10^6$ 個を同時に移植することで移植後早期の死亡を防ぐことができる。造血能低下の割合を一定にする点で、致死量のX線照射を行うことが好ましい。また、ドナー細胞とレシビエントにおいて、性、白血球の表面抗原あるいはアイソザイムの異なるものをマーカーとして用いれば、これらの違いを検出することによりキメリズムが成立したことを確認することができる。

このようにして作製されたキメラマウスを利用した、造血幹細胞の増殖あるいは分化を促進する因子のスクリーニングは、(a)該キメラマウスに被検化合物を投与する工程、(b)該キメラマウスに移植された造血幹細胞の増殖または分化を検出する工程、および(c)被検化合物の非投与の場合と比較して、造血幹細胞の増殖または分化を促進する化合物を選択する工程、を含む方法により実施することができる。スクリーニングに用いる被検化合物としては特に制限はなく、例えば、細胞の培養上清、精製タンパク質若しくはペプチド、合成化合物、微生物や植物に由来する天然物などが挙げられる。被検化合物のマウスへの投与は、経口、経肺、静脈内、皮内、皮下、腹腔内および／または脳室内等への投与により行うことができる。キメラマウスに移植された造血幹細胞の増殖または分化の検出は、例えば、被検化合物の投与後一定期間経過した該

キメラマウスから末梢血または骨髓細胞を採取し、ドナー由来の造血幹細胞数あるいは分化により生じたリンパ球、顆粒球等の各種血球細胞数を測定することで行うことができる。

ドナー由来の造血幹細胞数は表面抗原をマーカーとして用いて測定することができる。例えば、表面抗原としてLy5.1を有するドナー細胞を、表面抗原としてLy5.2を有するレシビエントに移植した場合、Ly5.1抗原陽性 (Ly5.1(+)) を組み合わせて、骨髓細胞に含まれるLin(-)/Sca-1(+)/c-kit(+)/CD48(-)/Ly5.1(+)細胞の割合をFACSを用いて測定することで、全骨髓細胞に含まれるドナー由来の造血幹細胞数を算出できる。脾臓、末梢血に含まれる造血幹細胞数も同様に測定することができる。各種血液細胞数は、さらに各種血液細胞に特異的な表面抗原を組み合わせることでドナー由来の各種血液細胞数を測定することができる。すなわち、B細胞の測定では、B細胞に特異的なB220抗原陽性 (B220(+)) を組み合わせて、Ly5.1(+)/B220(+)細胞の割合をFACSを用いて測定することでドナー由来のB細胞数を算出することができる。同様に、顆粒球ではGr-1抗原陽性 (Gr-1(+)) を組み合わせることでドナー由来の顆粒球数を算出することができる。

本発明における、造血幹細胞の増殖あるいは分化を促す因子のスクリーニングの他の態様は、本発明の細胞画分を被検化合物を接触後にマウスに移植し、造血幹細胞の増殖または分化を検出する方法に関する。このスクリーニング方法は、(a) 本発明の細胞画分に被検化合物を接触させる工程、(b) 被検化合物を接触させた細胞画分を培養する工程、(c) 培養した細胞画分を造血能が低下若しくは欠損したマウスに移植する工程、(d) 該マウスに移植された造血幹細胞の増殖または分化を検出する工程、および (e) 被検化合物を接触させない細胞画分を移植した場合と比較して、造血幹細胞の増殖または分化を促進する化合物を選択する工程、を含む。スクリーニングにおいて本発明の細胞画分に接触させる被検化合物としては、例えば上記した細胞の培養上清、精製タン

パク質若しくはペプチド、合成化合物、微生物や植物に由来する天然物などが挙げられるが、本発明の細胞画分をその増殖あるいは分化を促進する因子を産生していることが予想される支持細胞とともに培養し、該支持細胞が産生する化合物を被検化合物として用いることも可能である。

このスクリーニングの具体的な一例としては、まず、本発明の細胞画分に被検化合物を添加するか、あるいは該細胞画分を何らかの支持細胞（例えば骨髓由来のストローマ細胞、繊維芽細胞またはCHO細胞）の上に播種して一定期間培養する。その後培養した細胞を回収し、 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 個のレスキュー細胞と共に致死量X線照射したレシビエントマウスに移植する。また、半致死量X線照射したレシビエントマウスを用いる場合には、レスキュー細胞を移植する必要はない。個体間のばらつきをなくす観点から、致死量のX線照射を行うことが好ましい。これと並行して、培養に供したのと同数の細胞画分を同様のレシビエントマウスに移植をする。移植後一定期間経過した後、それぞれの細胞を移植したレシビエントの末梢血中に占めるドナー由来の血球の割合を比較することにより、造血幹細胞の増殖あるいは分化を促す因子をスクリーニングすることができる。

また、本発明の造血幹細胞の増殖あるいは分化を促す因子のスクリーニングの他の態様は、インビトロにおけるスクリーニングに関する。このスクリーニングは、(a) 本発明の細胞画分に被検化合物を接触させる工程、(b) 被検化合物を接触させた細胞画分を培養し、造血幹細胞の増殖または分化を検出する工程、および(c) 被検化合物の非投与の場合と比較して、造血幹細胞の増殖または分化を促進する化合物を選択する工程、を含む。スクリーニングにおいて用いる被検化合物としては、上記したスクリーニングと同様に細胞の培養上清、精製タンパク質若しくはペプチド、合成化合物、微生物や植物に由来する天然物、造血幹細胞の増殖あるいは分化を促進する因子を産生していることが予想される支持細胞により放出される化合物などが挙げられる。造血幹細胞の

増殖は、処理前後の細胞に含まれる造血幹細胞の割合を算出することで測定することができる。細胞に含まれる造血幹細胞の割合は、キメラマウスの作製時に移植する細胞数を変化させ、キメリズムの成立した個体数を測定することで測定することができる。造血幹細胞の分化は、分化した細胞に特異的な抗原に対する抗体により、FACSあるいは蛍光抗体法で測定することができる。たとえば、B細胞の特異抗原としてB220、顆粒球の特異抗原としてGr-1、赤芽球系細胞の特異抗原としてTER119が使用できる。また、CFU-GM、CFU-Mix、CFU-S等のコロニーアッセイにより測定することができる。

以上のスクリーニングの結果、有意な造血幹細胞の増殖または分化が検出されれば、スクリーニングに用いた被検化合物は、造血幹細胞の増殖または分化を促進する因子であると判定される。このような因子は、特に血液系疾患の治療薬開発において有用である。

本発明の細胞画分は、また、外来遺伝子を導入して、モデル実験動物に移植することにより、遺伝子治療の効果の判定において利用しうる。

具体的には、外来遺伝子を導入した細胞画分を、当該遺伝子産物の産生が見られないあるいは低下している動物に移植し、当該遺伝子産物の産生が見られないあるいは低下していることに基づく表現型が改善するかどうかにより治療効果を評価することができる。

例えば、Wマウス由来の造血幹細胞を含む細胞画分にc-kit遺伝子を導入し、これをWマウスに移植して貧血の改善を評価することができる。Wマウスとは、第5染色体W遺伝子座に異常があるマウスで、大球性貧血、肥満細胞欠損、不妊、白皮症という特徴的な症状を呈している (Russell, E.S., Adv. Genet. 20, 357-459, 1979)。c-kitはW遺伝子座に存在するレセプター型チロシンキナーゼ (Chabot, B., Nature, 335, 88-89, 1988) で、骨髓細胞のうち未熟な造血細胞に発現していることが示されている (Ogawa, M., J. Exp. Med. 174, 63-71, 1991)。従って、Wマウスではc-kitに変異がある未熟な造血細胞が正常に

機能せずに貧血になると考えられている。

なお、本発明の細胞画分への外来遺伝子の導入は、リン酸カルシウム法 (Virology (1973) 52, 456-467) やエレクトロポレーション法 (EMBO J. (1982) 1, 841-845) などの当業者に公知の方法で行うことができる。

また、本発明は、造血幹細胞に特異的な抗体に関する。本発明の抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の他、各種特殊抗体（例えば、Fab、F(ab)₂、一本鎖抗体、ヒト型化抗体、ヒト抗体など）が含まれる。本発明の抗体は当業者に公知の方法で調製することができる。ポリクローナル抗体であれば、例えば、本発明の細胞画分をラット、マウス、ウサギ等の異種動物に通常の方法で免疫し、血清から抗体画分を精製することで得ることができる。また、免疫した動物の脾臓細胞から通常の方法によりハイブリドーマを作製することでモノクローナル抗体を作成することもできる。細胞融合は基本的には公知の方法、例えば、ミルステインらの方法 (Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

得られた抗体が造血幹細胞に特異的なか否かの判定は、免疫された動物のイムノグロブリンを認識する蛍光標識抗体を用いて、得られた抗体の造血幹細胞に対する結合能をFACS解析することにより行うことができる。蛍光標識抗体は市販のものを用いることができる。

上記の方法で見出された、造血幹細胞に特異的な抗体を用いれば、造血幹細胞を簡便に単離することができる。例えば、蛍光標識された当該抗体を用いて、セルソーターにより当該抗体が結合する細胞を回収することができる。また、当該抗体を用いて、造血幹細胞を定量することができる。例えば、FACSにより蛍光標識された当該抗体の結合した細胞数を測定することができる。さらに、当該抗体が結合する造血幹細胞の表面抗原を同定すれば、造血幹細胞に特異的な表面抗原を見出すことが可能である。例えば当該表面抗原が発現していることが確認された細胞を用いて、細胞から膜画分を分離し、可溶化後、抗体を

用いたアフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、HPLC等の精製方法を用いて、抗体との結合能を指標に精製することができる。精製された蛋白はアミノ酸分析を行うことでアミノ酸の部分配列を同定し、さらに対応する塩基配列を有するプローブによりcDNAライブラリーから遺伝子を同定することができる。また、当該表面抗原が発現していることが確認された細胞のcDNAライブラリーを作製し、発現クローニング法を用いて、抗体との結合能を指標として遺伝子を単離することができる。

図面の簡単な説明

図1は、セルソーターによる細胞分離に用いたゲートの設定を示した。

比重1.063~1.077の骨髓細胞をSS（側方散乱）とFS（前方散乱）により正常細胞（図中R1）のゲートを設定した。ついで、Lin(Red613)とc-kit(Cy5)によりLin(-)/c-kit(+)細胞（図中R2）のゲートを設定し、最後に、Sca-1(PE)とCD48(FITC)によりLin(-)/Sca-1(+)/c-kit(+)/CD48(-)（図中R3）および、カウンターパートであるLin(-)/Sca-1(+)/c-kit(+)/CD48(+)（図中R4）のゲートを設定した。これらのゲート設定により得られた細胞数および算出された骨髓細胞に対する存在割合を併記した。

図2は、Lin(-)/Sca-1(+)/c-kit(+)/CD48(-)細胞（図中CD48(-)と表記）及びLin(-)/Sca-1(+)/c-kit(+)/CD48(+)細胞（図中CD48(+)と表記）を、それぞれ4個（6個体）及び40個（5個体）移植し、移植後147日目のマウスの末梢血を用いたPCRの結果を示した。

両図とも左端は分子量マーカールを示している。BM(m)は雄のマウスの骨髓細胞であり、BM(f)は雌のマウスの骨髓細胞を用いてPCRを行った結果であり、それぞれ陽性対照、及び陰性対照を示している。図の下に、表1の移植後147日後の結果を併記した。

発明を実施するための最良の形態

以下に本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例 1] Lin(-)/Sca-1(+)/c-kit(+)/CD48(-)細胞の分離

雄性C57Bl/6Nマウスから大腿骨を摘出し、その両端を切断した後、10%のFBSを含む2mlのIMDM培地（GIBCO社）を用いて骨髓細胞を採取した。得られた骨髓細胞含有液を一旦メッシュに通して骨片を除去した後、1000rpm(200×g)で5分間遠心（Hitachi, 05RP22）し、上清を除くことで骨髓細胞のペレットを得た。得られた骨髓細胞のペレットを2mlのNicodenz（比重1.063）（Nycomed社）に懸濁した。これを2mlのNicodenz（比重1.077）上に静かに重層した後、2300rpm(1000×g)で30分間遠心し、比重の異なる2種類のNicodenz層の境界領域に止まった細胞を回収した。得られた細胞をFACSバッファ（2%FCS含有PBS）で2回洗浄後、最終的に50μlのFACSバッファ中に懸濁した。この細胞懸濁液に対し、以下の分子に対するビオチン標識抗体溶液を加えた。マウスCD3ε、マウスCD45R(B220)、マウスLy-6G(Gr-1)、マウスCD11b(Mac-1)、マウスTER119（全てPharmingen社より購入）。尚、これらの抗体溶液の濃度はいずれも0.5mg/mlであり、添加量は1×10⁶の細胞当たり1μg(2μl)とした。抗体を加えた細胞懸濁液は30分間氷冷下に静置した。FACSバッファ1mlを加え、5000rpm(2000×g)で1分間遠心(KUBOTA社, KM-15200)して得られた細胞を再度FACSバッファ50μlに懸濁した。アビジンコートしたマグネティックビーズ懸濁液（Immunotech）を細胞1×10⁶当たり8μl添加し、30分間氷冷下に静置後、1mlのFACSバッファに懸濁し直した。マグネティックセパレーター（Perseptive Diagnostics, Solo-Sep）にかけ、磁石に吸着しない画分を回収し、5000rpm(2000×g)で1分間遠心(KUBOTA社, KM-15200)して得られた細胞を50μlのFACSバッファに懸濁し直し、以下の蛍光標識抗体溶液を細胞1×10⁶当たり1μg加えた。Strepta

vidin-Red 613(0.25mg/ml)(GIBCO BRL社)、APC標識抗マウスc-kit抗体(0.1mg/ml)(Pharmingen社)、PE標識抗Sca-1抗体(0.2mg/ml)(Pharmingen社)、FITC標識抗マウスCD48抗体(0.5mg/ml)(Pharmingen社)。これらの蛍光標識抗体を添加した細胞懸濁液を30分間氷冷下に静置し、5000rpm(2000×g)で1分間遠心した後、1mlのFACSバッファーに懸濁した。得られた細胞懸濁液を、セルソーター(コールター社、EPICS elite ESP)により分離し、目的とする表現型を有する細胞画分を回収した。セルソーターによる細胞分離を図1に示した。最終的に、Lin(-)/Sca-1(+)/c-kit(+)/CD48(-)細胞の大腿骨骨髓細胞中の存在頻度は約0.0006%であり、8週齢の雄性C57B1/6Nマウス的大腿骨2本から最終的に400~500個の細胞を得た。

[実施例2] 長期造血能の評価

雌性C57B1/6Nマウスに9GyのX線全身照射を行った後、一定数の雄性マウス由来の造血幹細胞画分細胞と 1×10^6 の雌性マウス由来の骨髓細胞とを、レシビエントであるX線全身照射マウスの尾静脈より移植した。移植後定期的にこれらのマウスの末梢血を採取し、オスの細胞に特異的に発現しているSry遺伝子をPCR法により検出する(Kunieda T.ら, Biol. Reproduction 46, 692, 1992)ことで、雄性マウスに由来する造血幹細胞による造血の有無を評価した。すなわち、レシビエントマウスから眼窩採血により得た末梢血をMilliQ水(ミリポア社)で10倍に希釈したものを沸騰させた水浴中で15分煮沸し、氷冷後、14,000rpmで5分間遠心(TOMY社, MRX-150)した上清20 μ lをPCRの鋳型とした。プライマーとして以下の合成オリゴDNA(サイメディアに合成を依頼)を用いた。Sry1(配列番号: 1/5'-GTGAGAGGCACAAGTTGGC-3')、Sry2(配列番号: 2/5'-TCTTAAACTCTGAAGAAGAGAC-3')、Sry3(配列番号: 3/5'-CTCTGTGTAGGATCTTCAATC-3')、Sry4(配列番号: 4/5'-GTCTTGCCTGTATGTGATGG-3')。20 μ lの鋳型に対しPCR反応用バッファー(タカラ社) 10 μ l、2.5 mM dNTP溶液(タカラ社) 8 μ l、20 pM Sry2プライマー 2 μ l、20 pM Sry4プライマー 2 μ lおよびMilliQ水57

.5 μ lを加え反応液とした。94°C 8分、60°C 2分の反応を3サイクル行った後Taqポリメラーゼ（タカラ社）0.5 μ lを加え、94°C 1分、60°C 2分30秒、72°C 2分30秒の反応を30サイクル行った。続いてこのPCR反応液10 μ lにPCR反応用バッファー 10 μ l、2.5 mM dNTP溶液8 μ l、20 pM Sry1プライマー 2 μ l、20 pM Sry3プライマー 2 μ l、MilliQ水67.5 μ lおよびTaqポリメラーゼ0.5 μ lを加え94°C 1分、60°C 2分30秒、72°C 2分30秒の反応を30サイクル行った。PCR反応後の溶液7.5 μ lについて4%アガロースゲル(NuSieve GTG agarose, タカラ社)上での電気泳動を行いトランスイルミネーターによりSry1-3産物である147 bpのバンドを検出した。陽性対照、及び陰性対照として、それぞれ雄の骨髓細胞及び雌の骨髓細胞を用いて測定を行った。移植後147日目のマウスの末梢血を用いたPCRの結果を図2に示した。

同様の実験を行い、移植後42日後および72日後の雄由来の細胞の検出を行い、長期造血能を評価した。表1にその結果を示す。表中、「CD48(-)」はLin(-)/Sca-1(+)/c-kit(+)/CD48(-)細胞を表し、「CD48(+)」はLin(-)/Sca-1(+)/c-kit(+)/CD48(+)細胞を表す。

表 1

Lin(-)/Sca-1(+)/c-kit(+)/CD48(-)細胞の長期造血能				
移植細胞	移植細胞数	ドナー由来の造血の見られたレシビエントの割合		
		移植42日後	移植72日後	移植147日後
CD48(-)	4 個	8/10	5/8	1/6
CD48(-)	40個	5/5	5/5	4/5
CD48(+)	4 個	0/10	0/7	0/6
CD48(+)	40個	5/8	4/6	1/5

Lin(-)/Sca-1(+)/c-kit(+)/CD48(-)細胞を4個あるいは40個移植したマウスでは、移植後147日目において、それぞれ1/6(17%)、4/5(80%)の割合で、Lin(-)/Sca-1(+)/c-kit(+)/CD48(-)細胞由来の造血が認められた。これに対し、この細胞のカウンターパートであるLin(-)/Sca-1(+)/c-kit(+)/CD48(+)細胞を移植した場合には、移植後147日目において、4個の細胞を移植したマウスでは6匹中0匹のマウスにおいて、また40個の細胞を移植したマウスでも5匹中1匹(20%)にのみLin(-)/Sca-1(+)/c-kit(+)/CD48(+)細胞由来の造血が見られたにすぎなかった。従って、長期造血能を有する造血幹細胞のほとんどはLin(-)/Sca-1(+)/c-kit(+)/CD48(-)の画分に含まれることが示された。

【実施例3】 リンパ球、単球/マクロファージ系細胞への多分化能の評価

雌性C57Bl/6N (Ly5.2) マウス (日本チャールズリバー社) 骨髓細胞を密度勾配遠心し、比重1.063と1.077の境界領域に浮遊する細胞を回収した。この細胞に、マウスCD3ε、マウスCD45R(B220)、マウスLy-6G(Gr-1)、マウスCD11b(Mac

-1)、マウスTER119 (0.5mg/ml) (全てPharmingen社) に対するビオチン標識抗体溶液を 1×10^6 の細胞当たり $1 \mu\text{g}$ 添加して懸濁し、30分間氷冷下に静置した。FACSバッファ-1mlにて洗浄後、アビジンコートしたマグネティックビーズ懸濁液 (Immunotech) を細胞 1×10^6 当たり $8 \mu\text{l}$ 添加し、30分間氷冷下に静置後、1mlのFACSバッファ-に再懸濁した。マグネティックセパレーター (Perseptive Diagnostics社, Solo-Sep) にかけて、磁石に吸着しない画分を回収し、5000rpm (2000 \times g) で1分間遠心 (KUBOTA社, KM-15200) して得られた細胞をLin(-)画分細胞とした。

9 GyのX線全身照射を行った雌性C57Bl/6N (Ly5.2) マウス (日本チャールズリバー社) をレシピエントマウスとして、100個の雄性C57Bl/6-Ly5.1マウス (O sawa, M. et al., J. Immunology, Vol. 156, 3207 (1996)) 由来のLin(-)/Sca-1(+)/c-kit(+)/CD48(-)画分細胞と 1×10^4 個の上記Lin(-)画分細胞とを、尾静脈より移植した。移植後71日目にレシピエントマウスの末梢血を採取し、Ly5.1マウスに由来する造血幹細胞による造血の有無を評価した。すなわち、レシピエントマウスから眼窩採血により得た末梢血20 μl に0.5 μl のFc block (0.5mg/ml) (Pharmingen社) を含む0.7%クエン酸加MEM培地 (GIBCO社) を等量添加して混和し、10分間室温静置した後、0.5 μl のTRC標識抗マウスCD11b (Mac-1) 抗体 (0.1mg/ml) (Caltag社)、0.5 μl のPE標識抗Thy1.2抗体 (0.2mg/ml) (Pharmingen社)、1.5 μl のPE標識抗CD45R (B220) 抗体 (0.1mg/ml) (Caltag社)、0.5 μl のFITC標識抗CD45.2 (Ly5.1) 抗体 (0.5mg/ml) (Pharmingen社) を含む10 μl の0.7%クエン酸加MEM培地を添加後、30分間室温静置した。これに1mlの1xFACS Lysing solution (Becton Dickinson社) を添加、混和後10分間室温静置した後、1mlのFACSバッファ-にて2回洗浄し、250 μl のFACSバッファ-に再懸濁した。FACSscan (Becton Dickinson社) を用いてこの細胞懸濁液中のLy5.1(+)/(B220(+)+Thy1.2(+)) 細胞およびLy5.1(+)/Mac-1(+)細胞の割合を測定し、それぞれドナー由来のリンパ球系造血および単球/マクロファージ系造血を確認した。

表 2

Lin(-)/Sca-1(+)/c-kit(+)/CD48(-)細胞の多分化能		
個体番号	ドナー由来リンパ球 系細胞の割合 (%)	ドナー由来単球/マクロファージ 系細胞の割合 (%)
1	22.27	21.04
2	23.43	5.52
3	0.46	9.75

Lin(-)/Sca-1(+)/c-kit(+)/CD48(-)細胞を移植したマウスは、移植後71日目において、3例中2例で、Lin(-)/Sca-1(+)/c-kit(+)/CD48(-)細胞由来の造血がリンパ球および単球/マクロファージの両系統で認められた。従って、Lin(-)/Sca-1(+)/c-kit(+)/CD48(-)画分は、多分化能を有し、かつ長期造血能を有する造血幹細胞を含むことが示された。

産業上の利用の可能性

本発明により、造血幹細胞を高頻度に含む細胞画分に調製方法が提供された。本発明の細胞画分は、キメラマウス中で、高い長期造血能を示すことができる。本発明の細胞画分は、造血幹細胞の増殖や分化を誘導する因子のスクリーニング、遺伝子治療の効果の判定、造血幹細胞に特異的な抗体または抗原のスクリーニングなど幅広い利用が可能である。

請求の範囲

1. マウス骨髓細胞からLin抗原陰性、Sca-1抗原陽性、c-kit抗原陽性、CD48抗原陰性の表現型を有する細胞を分離することを特徴とする、マウス造血幹細胞を含む実質的に均一な細胞画分の調製方法。
2. CD34抗原陰性の表現型をさらに有する細胞を分離することを特徴とする、請求項1に記載の方法。
3. 請求項1または2に記載の方法により調製された、マウス造血幹細胞を含む実質的に均一な細胞画分。
4. インビトロ培養細胞である、請求項3に記載の細胞画分。
5. 請求項3に記載の細胞画分及び培養液を含む細胞組成物。
6. 請求項3に記載の細胞画分を移植することを特徴とする、キメラマウスの作製方法。
7. 請求項3に記載の細胞画分が移植されたキメラマウス。
8. 造血能が低下または欠損したマウスに請求項3に記載の細胞画分を移植することにより作製されたキメラマウス。
9. 造血幹細胞の増殖または分化を促進する化合物をスクリーニングする方法であって、
 - (a) 請求項8に記載のキメラマウスに、被検化合物を投与する工程、
 - (b) 該キメラマウスに移植された造血幹細胞の増殖または分化を検出する工程、および
 - (c) 被検化合物非投与の場合と比較して、造血幹細胞の増殖または分化を促進する化合物を選択する工程、を含む方法。
10. 造血幹細胞の増殖または分化を促進する化合物をスクリーニングする方法であって、
 - (a) 請求項3に記載の細胞画分に被検化合物を接触させる工程、

- (b) 被検化合物を接触させた細胞画分を培養する工程、
 - (c) 培養した細胞画分を造血能が低下若しくは欠損したマウスに移植する工程、
 - (d) 該マウスに移植された造血幹細胞の増殖または分化を検出する工程、および
 - (e) 被検化合物を接触させない細胞画分を移植した場合と比較して、造血幹細胞の増殖または分化を促進する化合物を選択する工程、を含む方法。
11. 造血幹細胞の増殖または分化を促進する化合物をスクリーニングする方法であって、
- (a) 請求項3に記載の細胞画分に被検化合物を接触させる工程、
 - (b) 被検化合物を接触させた細胞画分を培養し、造血幹細胞の増殖または分化を検出する工程、および
 - (c) 被検化合物非投与の場合と比較して、造血幹細胞の増殖または分化を促進する化合物を選択する工程、を含む方法。
12. 請求項9から11のいずれかに記載の方法により単離しうる、造血幹細胞の増殖または分化を促進する化合物。
13. 外来遺伝子が発現可能に導入された、請求項3に記載の細胞画分。
14. 特定の内因性遺伝子の発現が抑制されていることにより特定の表現系を有する非ヒト哺乳動物に、該内因性遺伝子に対応する外来遺伝子が導入された請求項13に記載の細胞画分を移植し、該表現系が改善されるか否かを検出することを特徴とする、該特定の内因性遺伝子の発現の抑制に起因する疾患に対する治療効果の検出方法。
15. 請求項14に記載の検出方法に用いるための、請求項13に記載の細胞画分。
16. 請求項3に記載の細胞画分を動物に免疫する工程を含む、造血幹細胞に特異的な抗体の製造方法。

17. 請求項16に記載の方法により製造しうる、造血幹細胞に特異的な抗体。

18. 請求項17に記載の抗体を用いることを特徴とする、造血幹細胞を単離する方法。

19. 請求項17に記載の抗体を用いることを特徴とする、造血幹細胞を定量する方法。

20. 請求項17に記載の抗体を用いることを特徴とする、造血幹細胞に特異的な表面抗原の検出方法。

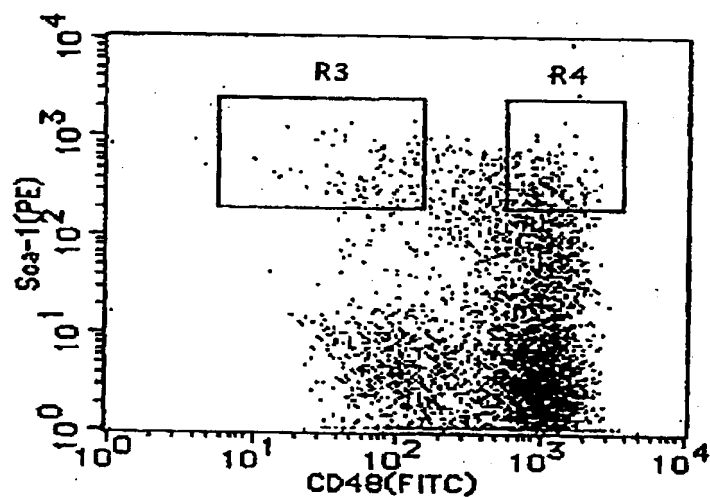
21. 請求項20に記載の方法により検出しうる、造血幹細胞に特異的な表面抗原。

1 / 2

図 1



R1且つR2



全細胞数: 130,072

R1 : 61,550 (47.3%)

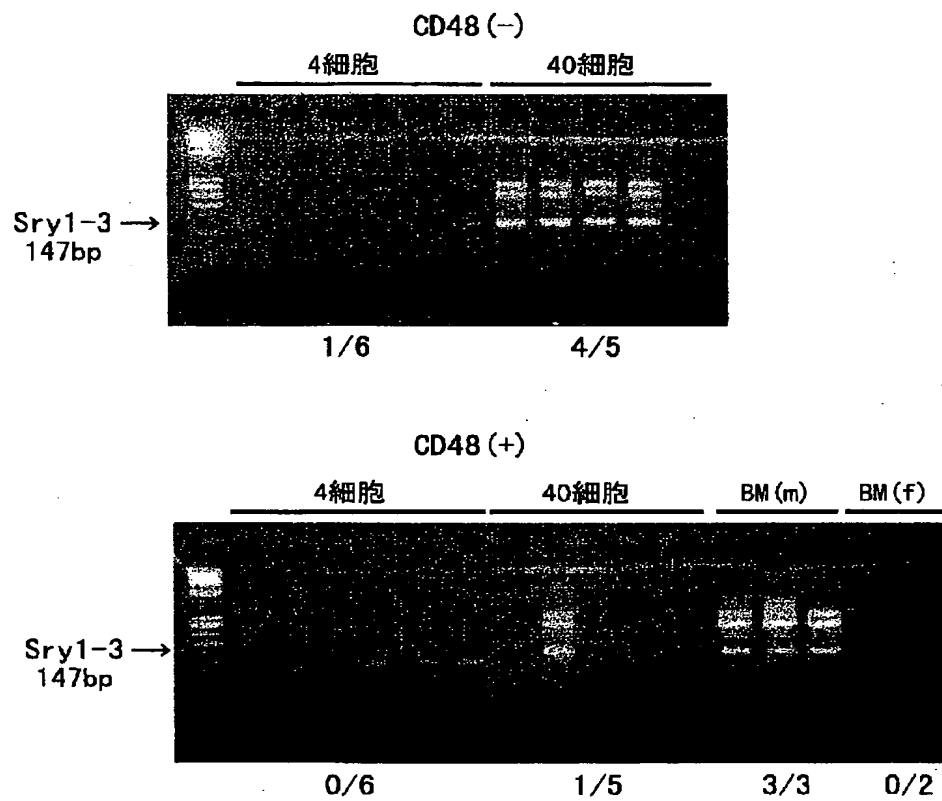
R1且つR2 : 10,031 (7.7%)

R1且つR2且つR3 : 148 (0.1%)

R1且つR2且つR4 : 338 (0.3%)

2 / 2

図 2



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

中外製薬株式会社

<120> Method for preparing hematopoietic stem cells

造血幹細胞を含む細胞画分の調整方法

<130> C1-004PCT

<140> JP 1998-248860

<141> 1998-09-02

<160> 4

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A primer for amplifying mouse
sry gene.

<400> 1

gtgagaggca caagttggc

19

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A primer for amplifying mouse
sry gene.

<400> 2

tcttaaactc tgaagaagag ac

22

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A primer for amplifying mouse
sry gene.

<400> 3

ctctgtgtag gatcttcaat c

21

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A primer for amplifying mouse sry gene.

<400> 4

gtcttgccctg tatgtgatgg

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04768

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁶ C12N5/06, C12N5/16, A01K67/027, C12Q1/02, C12P21/08, C07K16/28, C12N15/63																																			
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																																			
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁶ C12N5/06, C12N5/16, A01K67/027, C12Q1/02, C12P21/08, C07K16/28, C12N15/63																																			
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																																			
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)																																			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>JP, 10-94390, A (Tosoh Corporation), 14 April, 1998 (14.04.98), (Family: none)</td> <td>12, 17-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>1-11, 13-16</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>OSAWA, M. et al. "In vivo self-renewal of c-Kit+ Sca-1+ Linlow/- hemopoietic stem cells", J. Immunol. (1996), Vol. 156, No. 9, pages 3207-3214</td> <td>12, 17-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>1-11, 13-16</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP, 7-313150, A (Systemix, Inc.), 05 December, 1995 (05.12.95)</td> <td>17-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>& EP, 451611, A & US, 5061620, A & AU, 9173986, A & CA, 2039315, A</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP, 10-136978, A (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), 26 May, 1998 (26.05.98)</td> <td>17-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>& WO, 98/21313, A1</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>OSAWA, M. et al. "Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell", Science (1996), Vol. 273, No. 5272, pages 242-245</td> <td>17-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>1-16</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	JP, 10-94390, A (Tosoh Corporation), 14 April, 1998 (14.04.98), (Family: none)	12, 17-21	A		1-11, 13-16	X	OSAWA, M. et al. "In vivo self-renewal of c-Kit+ Sca-1+ Linlow/- hemopoietic stem cells", J. Immunol. (1996), Vol. 156, No. 9, pages 3207-3214	12, 17-21	A		1-11, 13-16	X	JP, 7-313150, A (Systemix, Inc.), 05 December, 1995 (05.12.95)	17-21	A	& EP, 451611, A & US, 5061620, A & AU, 9173986, A & CA, 2039315, A	1-16	X	JP, 10-136978, A (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), 26 May, 1998 (26.05.98)	17-21	A	& WO, 98/21313, A1	1-16	X	OSAWA, M. et al. "Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell", Science (1996), Vol. 273, No. 5272, pages 242-245	17-21	A		1-16
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																																	
X	JP, 10-94390, A (Tosoh Corporation), 14 April, 1998 (14.04.98), (Family: none)	12, 17-21																																	
A		1-11, 13-16																																	
X	OSAWA, M. et al. "In vivo self-renewal of c-Kit+ Sca-1+ Linlow/- hemopoietic stem cells", J. Immunol. (1996), Vol. 156, No. 9, pages 3207-3214	12, 17-21																																	
A		1-11, 13-16																																	
X	JP, 7-313150, A (Systemix, Inc.), 05 December, 1995 (05.12.95)	17-21																																	
A	& EP, 451611, A & US, 5061620, A & AU, 9173986, A & CA, 2039315, A	1-16																																	
X	JP, 10-136978, A (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), 26 May, 1998 (26.05.98)	17-21																																	
A	& WO, 98/21313, A1	1-16																																	
X	OSAWA, M. et al. "Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell", Science (1996), Vol. 273, No. 5272, pages 242-245	17-21																																	
A		1-16																																	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																																			
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																																			
Date of the actual completion of the international search 24 November, 1999 (24.11.99)		Date of mailing of the international search report 07 December, 1999 (07.12.99)																																	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer																																	
Facsimile No.		Telephone No.																																	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04768

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 6-269293, A (Sumitomo Electric Industries, Ltd.), 27 September, 1994 (27.09.94), (Family: none)	1-21

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/04768

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N5/06, C12N5/16, A01K67/027, C12Q1/02, C12P21/08, C07K16/28, C12N15/63

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N5/06, C12N5/16, A01K67/027, C12Q1/02, C12P21/08, C07K16/28, C12N15/63

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 10-94390, A (東ソー株式会社) 14. 4月. 1998 (14. 04. 98)	12, 17-21
A	特許庁ファミリーなし	1-11, 13-16
X	OSAWA, M. et al. "In vivo self-renewal of c-Kit ⁺ Sca-1 ^{low} hemopoietic stem cells", J. Immunol. (1996) 第156巻, 第9号 p. 3207-3214	12, 17-21
A		1-11, 13-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 11. 99

国際調査報告の発送日

07.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

印

4 B

9 7 3 5

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 7-313150, A (システミックス, インコーポレイテッド) 5. 12月. 1995 (05. 12. 95) &EP, 451611, A &US, 5061620, A &AU, 9173986, A &CA, 2039315, A	17-21
A		1-16
X	JP, 10-136978, A (大塚製薬株式会社) 26. 5月. 1998 (26. 05. 98) &WO, 98/21313, A1	17-21
A		1-16
X	OSAWA, M. et al. "Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell", Science (1996) 第273巻, 第 5272号 p. 242-245	17-21
A		1-16
A	JP, 6-269293, A (住友電気工業株式会社) 27. 9月. 1994 (27. 09. 94) パテントファミリーなし	1-21